



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Valentina Starešinčić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**DETEKCIJA I ODREĐIVANJE ARSENA U
LJUDSKOM TIJELU**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Nevenka Poje

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. kolovoza 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Nevenka Poje

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1 UVOD.....	8
1.1 Svojstva arsena.....	8
1.2 Spojevi arsena.....	9
1.3 Toksičnost arsena.....	10
§ 2 PRIKAZ ODABRANE TEME	12
2.1 Arsen u ljudskom tijelu	12
2.1.1 Određivanje arsena u krvi	13
2.1.2 Određivanje arsena u urinu	14
2.1.3 Određivanje arsena u kosi i noktima	14
2.2 Metode određivanja arsena	17
2.2.1 Suvremene instrumentne metode	17
2.2.2 Klasične metode	19
2.3 Zaključak.....	22
POPIS KRATICA.....	23
§ 3 LITERATURNI IZVORI.....	XXIV

§ Sažetak

Arsen je svima poznati otrov. Nakuplja se u organima i tkivima i tijelo kronično truje. Koncentracija toksina određuju se u tzv. biomarkerima izloženosti: krvi, urinu, kosi i noktima. Arsen u kosi i noktima je stabilan pa se najčešće u njima određuje. Biološki uzorci sadrže organske tvari koje smetaju analizi te se prije određivanja moraju ukloniti. Moderne analize vezanim sistemima ICP-MS, HPLC-ICP-MS brze su i imaju niske granice detekcije pa se sve više koriste. U ovom Završnom radu opisane su i druge metode određivanja arsena. Klasičnim metodama: *Marsh-Berzelius*-ovom i *Gutzeit*-ovom arsen se određivao u organima i tkivima mrtvih.

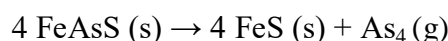
§ 1. UVOD

1.1. Svojstva arsena

Arsen je kemijski element 15. (dušikove) skupine periodnog sustava elemenata. Simbol mu je As, a atomski broj 33. Pripada skupini metaloida.² Otkrio ga je Albert Magnus 1250. godine. Naziv arsen dolazi iz grčke riječi *arsenikon* što označava žuti pigment. Temperatura tališta mu je 817 °C, a temperatura vrelišta 613 °C.³

Na sobnoj temperaturi i kod atmosferskog tlaka, arsen je krutina sive boje. Pojavljuje se u tri različite alotropske modifikacije: amorfni arsen, metalni ili sivi arsen i rompski arsen. Sivi arsen je metalnog sjaja i čelično sive boje. To je najstabilnija alotropska modifikacija karakteristične, slojevite strukture. Rompski arsen (beta arsen) je žute boje, nestabilan i na sobnoj temperaturi prelazi u metalni arsen. Amorfni arsen, poznat kao crni arsen nastaje sublimacijom arsena u inernim uvjetima.²

U prirodi se nalazi u rudama: arsenopirit (FeAsS), crveni realgar (As_4S_4) i auripigment (As_2S_3) prikazan na slici 1. Termičkim raspadom arsenopirita bez prisutnosti zraka nastaje arsen u elementarnom stanju i nema neku posebnu primjenu:²

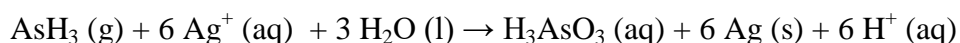


Slika 1. Auripigment⁴

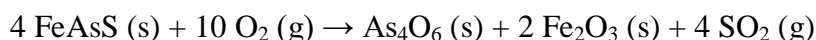
1.2. Spojevi arsena

Spojevi arsena primjenjuju se u farmaceutskoj industriji, industriji kože, staklarskoj industriji, poljoprivredi i drugim područjima.² Mogu se svrstati u anorganske i organske. Anorganski spojevi arsena izrazito su toksični^{1,3} i kancerogeni¹. Organski spojevi manje su toksični i manje opasni za zdravlje.¹ Anorganski spojevi su spojevi arsena s kisikom, sumporom i halogenim elementima.² Organski spojevi arsena su organometalni spojevi s karakterističnom kovalentnom ugljik-metal vezom. Ima ih u biljkama i životinjama.⁵

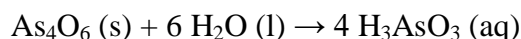
Arsen ima više oksidacijskih stanja: -3, 0, +3 i +5. Najstabilnije je +3 stanje. Oksidacijski stupanj -3 ima u plinu arsinu (hidrid arsena). Arsin je jedan od najjačih anorganskih otrova karakterističnog mirisa po češnjaku. Jako je redukcijsko sredstvo; iz otopine srebrovih soli može istisnuti srebro (Gutzeitova proba):²



Halogenidi arsena (III) su kovalentni spojevi. Arsenov(III) fluorid i arsenov(III) klorid su tekući na sobnoj temperaturi, arsenov(III) bromid je krutina niskog tališta, a arsenov(III) jodid je crvenosmeđa krutina. Arsenov(III) oksid je bijela kristalinična tvar. Otrovan je, a koristi se u poljoprivredi za suzbijanje štetočina (mišomor)² i kao primarni standard za standardizaciju otopina joda.¹⁸ Dobiva se prženjem sulfidnih ruda arsena, a može se dobiti i izgaranjem arsena na zraku, prema reakciji:²



Otapanjem arsenova(III) oksida u vodi nastaje slaba arsenitna kiselina koja je stabilna samo u vodenim otopinama. Nije izolirana u čistom stanju. Reakcija dobivanja arsenitne kiseline je:²



Soli arsenitne kiseline koriste se kao insekticidi u poljoprivredi.

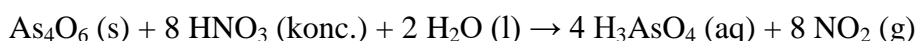
Arsen(V) tvori halogenide samo s fluorom i klorom. Arsenov(V) fluorid je na sobnoj temperaturi bezbojan plin i najstabilniji pentahalogenid arsena. Arsenov(V) klorid nastaje

reakcijom plinovitog klorida i arsenova(III) klorida na nižoj temperaturi pod utjecajem ultraljubičastog zračenja.

Arsenov(V) oksid je krutina. Nastaje dehidratacijom arsenatne kiseline na povišenoj temperaturi:²



Arsenov(V) oksid je termički nestabilan i ne može se dobiti izgaranjem arsenova (III) oksida na zraku jer trenutno disocira na kisik i As_2O_3 . Arsenatna kiselina se, stoga, pripravlja oksidacijom spojeva arsena(III) s koncentriranom dušičnom kiselinom:²



Uvođenjem sumporovodika u kiselu vodenu otopinu arsenatne kiseline, dolazi do stvaranja žutog arsenovog(V) sulfida. Soli arsenatne kiseline koriste se kao insekticidi.²

1.3. Toksičnost arsena

Toksičnost arsena i njegovih spojeva poznata je od Srednjeg vijeka kada je postao sinonim za otrov. Trovanja su u prošlim vremenima bila sastavni dio političkog i društvenog života. Spojevi s arsenom bili su idealni za uklanjanje neprijatelja. Bez boje su, mirisa i okusa, a male količine otrova su smrtonosne. Simptomi trovanja pripisivani su trovanju hranom. Trovalo se najčešće s arsenovim(III) oksidom („bijeli arsen“, „mišomor“). Zabilježena su i slučajna trovanja arsenom (boja za zidove, kozmetički preparati, dječje igračke i sl.).⁵

Anorganski spojevi arsena toksičniji su od organskih. Topljiviji su pa se lakše apsorbiraju. Organski spojevi arsena teže su topljivi, duže se apsorbiraju i uglavnom izlučuju urinom. Najveće količine arsena u ljudsko tijelo dopijevaju u obliku anorganskog arsena u oksidacijskom stanju +3. Najpoznatiji anorganski spojevi arsena su arsenov(III) oksid i arsin. Oba su izrazito toksična. Arsin se, za razliku od As_2O_3 , lako prepoznaje po karakterističnom mirisu na češnjak. Neki spojevi arsena(V) prolaze staničnu membranu, As(V) se reducira u stabilniji arsen(III) koji se dulje zadržava u organizmu. Arseniti i arsenati su topljivi u vodi, brzo ulaze u krvotok pa se mogu detektirati u uzorku krvi. Metilarsenatna kiselina

$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMA) i dimetilarsenatna kiselina $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ (DMA) mogu se naći u ljudskom tijelu. Nisu kancerogene, ne zadržavaju se dugo u organizmu. Organizam jedan dio arsena koji uđe izbacuje, a drugi se nakuplja u organima i tkivima.⁵

Akutna trovanja arsenom su danas vrlo rijetka. Prvorazredni problem su kronična trovanja i profesionalno izloženih i šire populacije koja, također, dolazi u kontakt s njim. Kronično trovanje arsenom je posljedica nakupljanja arsenovih spojeva u organizmu uslijed dugotrajne izloženosti. Akutno trovanje je posljedica naglog izlaganja organizma većim količinama arsena.⁵

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Arsen u ljudskom tijelu

Arsena ima u tlu, vodi, hrani i atmosferi. Glavni izvori su hrana i voda s povišenim koncentracijama toksina. U tijelo čovjeka ulaze oralnim putem. Svakodnevnom konzumiranjem organizam se polako truje. Za zdravlje je hrana životinjskog i biljnog porijekla s povišenom koncentracijom arsena manje opasna od vode jer sadrži manje toksične organske spojeve arsena. Disanje (pluća) i apsorpcija (koža) također su putovi ulaska.⁵

Povišena koncentracija arsena u vodi vrlo je opasna za zdravlje jer se voda svakodnevno konzumira. U nekim dijelovima svijeta pa i naše domovine, prirodne su vode bogate arsenom. Tako su, primjerice, u vodi za piće u Bangladešu nađene koncentracije do $2500 \mu\text{g L}^{-1}$, u Indiji do $3200 \mu\text{g L}^{-1}$, Argentini do $7550 \mu\text{g L}^{-1}$, Meksiku do $620 \mu\text{g L}^{-1}$, u SAD-u do $2600 \mu\text{g L}^{-1}$, Njemačkoj do $150 \mu\text{g L}^{-1}$. (ref. 1) U dijelu istočne Slavonije određeno je visokih $491 \mu\text{g L}^{-1}$. (ref. 6) Hrvatska je prihvatila preporuku Svjetske zdravstvene organizacije pa je sad maksimalna dopuštena koncentracija (MDK) arsena u vodi za piće $10 \mu\text{g L}^{-1}$, a voda u Slavoniji se pročišćava (ref. 5-7). Visoke koncentracije se povezuju s učestalom pojavom određenih bolesti: karcinom kože, pluća, mokraćnog mjehura, bubrega i jetre. Stanovništvo Bangladeša je, što se arsena tiče, najugroženije na svijetu.¹ Koncentracija arsena u vodi iznad $100 \mu\text{g L}^{-1}$ kod kronične oralne izloženosti uzrokuje pojavu kožnih lezija na dlanovima i stopalima. Stoga je voda dobar biomarker izloženosti.⁵⁻⁷

Ljudski organizam kod kroničnog trovanja prolazi nekoliko stadija; u prvom stadiju povećana je koncentracija arsena u urinu, krvi, kosi i noktima, a u drugom stadiju dolazi do pojave kožnih lezija i pigmentacijskih promjena kože. Konačni je rezultat razvoj teških bolesti.^{5,7} Granična dopuštena vrijednost izloženosti za arsenov(III) i arsenov(V) oksid, arsenite i arsenate je $10 \mu\text{g L}^{-1}$, a za arsin $16 \mu\text{g L}^{-1}$. (ref. 8).

Zbog zaštite zdravlja stanovništva važno je detektirati toksin u prvom stadiju, prije pojave simptoma bolesti. Razina toksina u biomarkerima (krv, urin, kosa i nokti) može se smanjiti prestankom izlaganja.⁷

2.1.1. Određivanje arsena u krvi

Analiza bioloških uzoraka kao što su krv, urin, kosa i nokti svakako je zahtjevnija od analize toksina u otopini. Biološki uzorci uvijek sadrže i dodatne tvari koje interferiraju i smetaju određivanju. Stoga se određenim postupkom (digestija) prvo uklanja takove tvari. Procedure određivanja različitih biomarkera arsena dobro su opisane u analitičkoj literaturi.

Arsen ima veliki afinitet prema proteinima pa brzo napušta krvotok i akumulira se u tkivima.⁹ Vrijeme poluživota anorganskog arsena u krvi je 4-6 sati, a vrijeme poluživota metiliranih metabolita je 20-30 sati. Abnormalna koncentracija arsena u krvi (veća od 12 ng mL⁻¹) upućuje na značajnu izloženost arsenu, a može se odrediti kratko nakon izlaganja. Vjerojatnost nalaska arsena u krvi dva dana nakon izlaganja nije moguća.⁹

Injekcijom za jednokratnu upotrebu iz vene se uzima uzorak krvi (5 mL). Bitno je da se uzorak ne kontaminira te da se ne izgubi arsen. Uzorak se prebaci u čistu polipropilensku epruvetu od 10 mL, doda heparin za sprječavanje zgrušavanja krvi i zadržavanje tekućeg oblika. Epruveta se, zatim, numerira i stavi u „krio posudu“ koja sadrži kockice leda. Do početka analize uzorak se drži u hladnjaku na 4 °C.¹⁰

Arsen se u krvi može odrediti *induktivno spregnutom plazmom vezanom s masenom spektroskopijom*. Otopina uzorka se peristaltičkom pumpom prenosi u nebulizator gdje se pretvara u aerosol. Dobiveni aerosol se u struji argona unosi u centar induktivno spregnute plazme. Visoka temperatura plazme isparava i ionizira uzorak. Ioni se usmjeravaju u maseni spektrometar, dolaze na detektor brzinom ovisnom o omjeru naboja i mase.

Induktivno spregnuta plazma sastoji se od tri kvarcne epruvete i zavojnice koja proizvodi visokoenergetske radiofrekvencijske valove. Temperatura plazme je oko 6000 K. Plazmu induciraju atomi argona osciliranjem u visokoenergetskom radiofrekventnom polju. Najčešće upotrebljavani analizator mase je kvadrupolni analizator.¹¹ Metoda je vrlo osjetljiva i pogodna za određivanje različitih elemenata. Kad se analizira arsen, perklorna i klorovodična kiselina ne smiju se koristiti za pripreme uzorka za analizu zbog stvaranja argonovog klorida koji utječe na rezultate mjerenja. Dobivene pogreške mogu se ispraviti korištenjem ICP-MS-a visoke rezolucije ili naknadnim korekcijama dobivenih rezultata odgovarajućim jednadžbama.¹¹

2.1.2. Određivanje arsena u urinu

Koncentracija arsena u urinu pokazuje je li osoba nedavno bila u kontaktu s arsenom. Urinom arsen izlazi iz organizma pa nađena količina ne govori o apsorbiranoj količini.¹²

Uzorak je prvi jutarnji urin. Uzorak se stavi u polietilensku bocu i drži do početka analize u hladnjaku na 4 °C. Dva sata prije samog mjerenja, uzorak se termostatira na sobnoj temperaturi.¹³ Urin se čuva na niskoj temperaturi (od -20 °C do 4 °C) zbog moguće kontaminacije. Analizu se mora načiniti u određenom roku; najkasnije dva dana od uzimanja uzorka.

Vezanim sustavom *HPLC-ICP-MS* različiti oblici arsena koje sadrži urin: anorganski arsen(III), arsen(V) i organski arsen odvajaju se i kvantitativno određuju.¹³ Uređaj za *HPLC* koji sadrži kolonu s anionskim izmjenjivačem veže se s *ICP-MS*-om. Kromatografska kolona ima vezanu hidrofilnu, anionsku izmjenjivačku smolu. Mobilna faza (najčešće tekućina) se pod visokim tlakom pumpa kroz kolonu. Unošenjem uzorka u tok mobilne faze dolazi do različitih interakcija koje ujeću na različito vrijeme zadržavanja komponenata smjese na koloni. Korištenje visokog tlaka povećava rezoluciju kromatograma jer sprječava dugo zadržavanje komponenata na koloni. Nebulizator s komorom za uvođenje uzorka omogućava jednosnopno uvođenje uzorka s kromatografske kolone u induktivno spregnuti plazma izvor. Komora za uvođenje uzorka ohladi se na 5 °C kako bi se osigurala temperaturna stabilnost i smanjila količina vodene pare prisutne u protoku plina. Nebulizator otopinu uzorka pretvara u aerosol. Aerosol se uvodi u centar induktivno spregnutog plazma izvora. Visoka temperatura plazme isparava i ionizira uzorak. Ioni se usmjeravaju u maseni spektrometar gdje se razdvajaju i detektiraju na temelju omjera mase i naboja.¹³

Prednosti *ICP-MS*-a su osjetljivost, specifičnost i sposobnost detekcije vrlo malih količina arsena (ng L⁻¹ do mg L⁻¹). Zbog toga se često koristi za analizu urina.¹³

2.1.3. Određivanje arsena u kosi i noktima

Nakupljeni arsen u noktima i kosi je stabilan pa se najčešće u njima određuje. Koncentracija mu se ne mijenja niti nakon nekoliko mjeseci stajanja pa se s analizom ne mora žuriti. Bitni su za dokazivanje kumulativnog efekta arsena na ljudski organizam, ali se lako izvana kontaminiraju. Kosa i nokti se prije analize moraju razgraditi, a određuju se istom metodom.^{12,14}

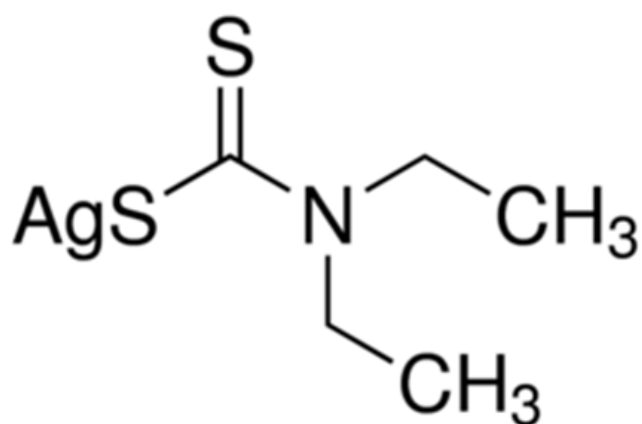
Koncentracije arsena obično su veće u kosi i noktima nego u drugim dijelovima tijela, zbog znatne količine keratina. SH skupine cisteina vežu anorganski arsen u oksidacijskom stanju +3. Organski se arsen ne nakuplja u kosi i noktima pa se njihovom analizom određuje samo anorganski. Koncentracija arsena u kosi iste osobe može varirati pa se uzorak uzima s područja različito udaljenih od korijena. Analiziraju se obično nokti nogu. Na kosu i nokte arsen može dospjeti i adsorpcijom iz atmosfere. Prednost biomarkera kose je da se vrijeme izlaganja može procijeniti određivanjem koncentracije arsena duž vlasi kose (segmentna analiza).^{12,14}

Glavni nedostatak ovih biomarkera je teško razlikovanje arsena iz organizma i vanjskog arsena. Zbog znatnijeg nakupljanja bolji biomarker su nokti. Za analizu se uzima 1 g uzorka. Kosa se reže na udaljenosti oko 1 cm od vlasišta. Oba biomarkera čuvaju se u polietilenskim vrećicama. Prije same analize moraju se dobro oprati i razgraditi.^{12,14}

Kosa se priprema na sljedeći način: uzorak se ispere acetonom, višak acetona ukloni centrifugiranjem. Zatim se ispere deioniziranom vodom i homogenizira potresivanjem epruvete. Postupak ispiranja acetonom i deioniziranom vodom se ponovi. Nakon toga se suši na temperaturi od 50 °C. Osušena kosa se usitni (veličina do 1 mm) i čuva na sobnoj temperaturi u polietilenskoj epruveti. Suhom i čistom uzorku mase 0,1 g doda se 3 mL koncentrirane dušične kiseline i 1 mL vodikovog peroksida ($w=0,30$). Smjesa se grije u mikrovalnoj pećnici tako da se svakih nekoliko minuta povećava snaga zagrijavanja. Kad se ohladi može se određivati arsen.¹⁵

Nokti su kao i kosa skloni kontaminaciji izvana pa ih treba prije razgradnje dobro očistiti. Nokti se isperu destiliranom vodom pa acetonom (3 mL) i konačno deioniziranom vodom kako bi se uklonio sav aceton. Isprani nokti suše se na sobnoj temperaturi (1 - 2 sata) i važu. Zatim se prenesu u tikvicu, preliju smjesom: dušične (0,3 mL), sumporne (3 mL) i perklorne kiseline (1 mL). Kiseline razgrade keratin pa se arsen može odrediti.¹⁶

Određivanje *spektrometrijskom metodom sa srebrovim dietilditiokarbamatom* i elementarnim cinkom u kiselom mediju. Strukturna formula srebrovog dietilditiokarbamata prikazana je na slici 2. Analiza ovom metodom uključuje dodatno prevođenje arsena u arsin, a potom u obojeni kompleks koji apsorbira u vidljivom području. To se radi u aparaturi prikazanoj na slici 3.



Slika 2. Molekulska formula srebrovog dietilditiokarbamata



Slika 3. Aparatura za detekciju i određivanje arsena spektroskopskom metodom sa srebrovim dietilditiokarbamatom¹⁷

Nascentni vodik koji nastaje reakcijom cinka i kiseline reducira arsen u uzorku do arsina, plinoviti arsin uvodi se, zatim u kloroformsku ili piridinsku otopinu srebrovog dietilditiokarbamata i mjeri apsorpcija nastalog crvenoljubičastog kompleksa na valnoj duljini 535 nm.¹⁶ Metoda je jednostavna, ima nisku granicu detekcije i ne zahtijeva osobitu instrumentaciju; umjesto UV/VIS spektrofotometra dovoljan je kolorimetar.

2.2. Metode određivanja arsena

Kemijska analiza je skup analitičkih metoda i tehnika za određivanje kemijskog sastava i strukture neke tvari. Kvalitativnom analizom prikupljaju se informacije o kemijskom identitetu analita u uzorku, a kvantitativna analiza daje brojčane podatke o relativnim količinama jednog ili više analita.¹⁸ Kvalitativna analiza obično se radi prije kvantitativne. Dobre analitičke metode dokazivanja i određivanja arsena razvijene su u 19. stoljeću. Mogućnost dokazivanja otrova u tijelu ubijenih bila je razlog brzom i značajnom padu namjernih trovanja.

Danas se, međutim, istražuje uglavnom izloženost poznatom toksinu pa je dovoljna kvantitativna analiza.¹⁸ Rijetko je uzrok trovanja nepoznat. U tom slučaju se prvo utvrđuje identitet, a onda se određuje njegova koncentracija u organizmu.

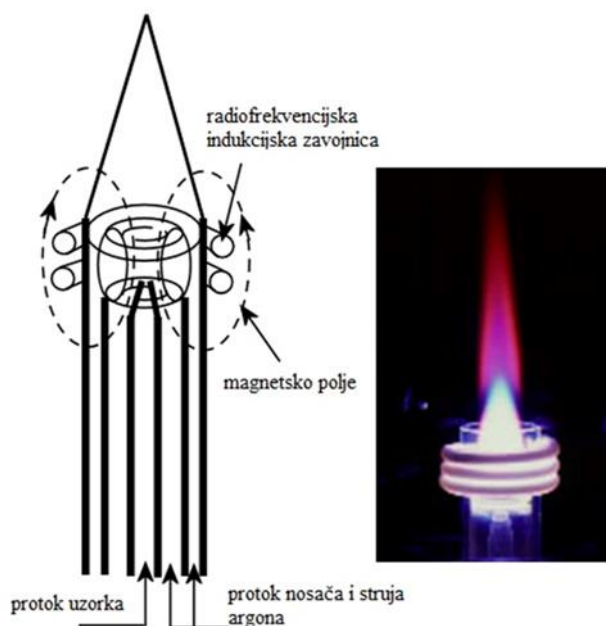
2.2.1. Suvremene instrumentne metode

Većina opisanih metoda koristi se osim za analizu bioloških uzoraka i za određivanje arsena u vodi i inim uzorcima. Svaki pojedini uzorak prethodnim se postupcima dovodi u oblik prikladan za analizu izabranom metodom. Svaka metoda ima granice detekcije o kojima također treba voditi računa. Uzorak se prema potrebi može koncentrirati ili razrijediti.

Osim opisanih, u praksi se često koristi *atomska apsorpcijska spektrometrijska metoda* (AAS) za analizu kako vode, tako i bioloških uzoraka: urina, kose, nokata. Neki se uzorci, kako je opisano ranije, prije analize razgrađuju. Granica detekcije As u biološkim uzorcima ovom metodom je od 0,6 do 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ref. 1). Određuje se ukupni arsen tako da se prvo sav arsen oksidira u arsen(V), zatim As(V) reducira s kalijevim jodidom ili kositrovim(II) kloridom u arsen(III). Konačno se dobije arsin s cinkom i klorovodičnom kiselinom. Redukciju se može raditi i s natrijevim borhidridom i klorovodičnom kiselinom. Arsin se uklanja iz otopine aeracijom s dušikom u vodikov plamen i mjeri apsorpcija na 193,7 nm.⁵

Induktivno spregnuta plazma (ICP) za spektrokemijske analize razvijena je 1960. godine. Upotrebljava se kao izvor iona prilikom pobude uzorka. Dobivena plazma je gusta smjesa visoko pobuđenih elektrona, iona, metastabilnih i neutralnih vrsta. Radna temperatura induktivno spregnute plazme je vrlo visoka (od 5000 do 10 000 K) što dovodi do desolvatacije i termičke atomizacije analita uvedenog u centar plazme.¹⁹ Za detekciju i određivanje arsena u krvi, urinu, kosi i noktima koriste se vezani sistemimi: ICP-MS, ICP-

AES, HPLC-ICP-MS. Vezani sustav ICP-MS je prije detaljnije opisan; izuzetno visoka temperatura omogućava pretvorbu atoma uzorka u ione koji se separiraju i detektiraju spektrometrom masa. Induktivno spregnuta plazma vezana s masenim spektrometrom visoke rezolucije sve više se koristi za analizu bioloških uzoraka (urin, nokti) i vode. Granica detekcije arsena ovom metodom je oko $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. HPLC-ICP-MS je prikladna za analizu vode, urina kose i nokata.(ref. 19.) Granica detekcije arsena ovom metodom je od 0,14 do $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$. (ref. 1.) Induktivno spregnuti plazma izvor prikazan je na slici 4.



Slika 4. Induktivno spregnuti plazma izvor²⁰

Vezani sistem *induktivno spregnuta plazma i atomska emisijska spektrometrija* (ICP-AES) manje se koristi za analizu bioloških uzoraka. Granica detekcije arsena ovom metodom je oko $30 \mu\text{g L}^{-1}$.

Opisana *spektrometrijska metoda sa srebrovim dietilditiokarbamatom* koristi se za određivanja arsena u krvi, urinu, kosi, noktima i vodi. Granica detekcije arsena ovom metodom je oko $40 \mu\text{g L}^{-1}$. (ref. 1)

Anodna voltametrija s akumulacijom (ASV) često se koristi za analizu vode i bioloških uzoraka.^{5,21,22} Glavna prednost metode je niska cijena. Voltametrija s akumulacijom odvija se u dva stupnja. Prvi je stupanj akumulacija ili pretkoncentracija analiziranog uzorka na

površini radne elektrode elektrodpozicijom uz konstantni potencijal. U drugom se stupnju akumulirani analit otapa linearnom promjenom potencijala odgovarajućeg smjera. Metalni ion se u prvom stupnju reducira, a u drugom oksidira. Mjeri se struja anodnog otapanja. Struja vrha vala na krivulji proporcionalna je početnoj koncentraciji analiziranog sastojka u otopini.²³ Granica detekcije arsena ovom metodom je $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$. (ref. 21)

Granica detekcije je najmanja količina analita koju je odabranom metodom moguće točno odrediti. U tablici 1. istakute su granice detekcije važnijih instrumentnih metoda.

Tablica 1. Odabrane spektroskopske metode s odgovarajućim granicama detekcije arsena¹

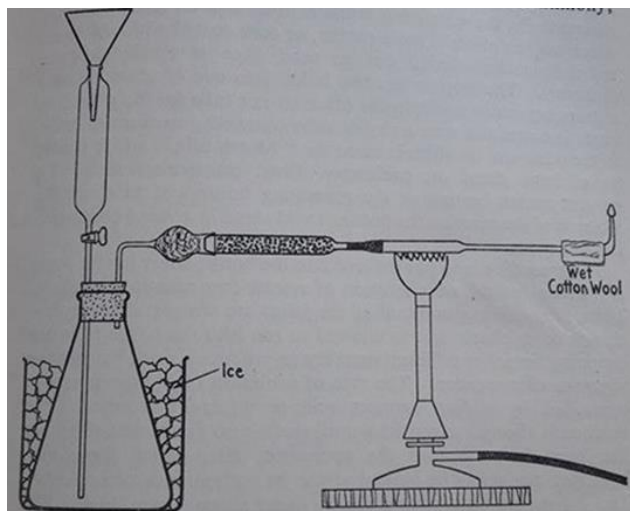
Metoda	Granica detekcije / $\mu\text{g L}^{-1}$
ICP - AES	~ 30
ICP - MS	$\sim 0,1$
HPLC - ICP - MS	0,14 – 0,33
HG - AAS	0,6 - 6
ASV	$\sim 0,15$
spektrofotometrija	~ 40

2.2.2. Klasične metode

Tijekom 19. stoljeća otkriveni su mnogi testovi za identifikaciju arsena i razvijene metode kvantitativne analize. Izvrsne analitičke metode omogućile su određivanje otrova u tlu, organima i kostima otrovanih. Najvažnije su: Marsh-Berzeliusova metoda, Gutzeitova metoda i Bettendorfov test.²⁴

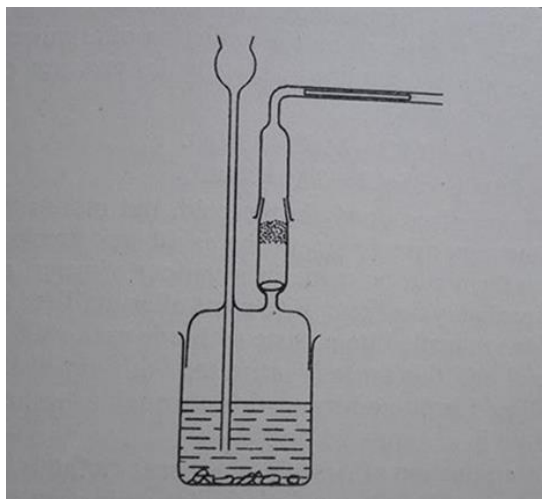
Marsh – Berzeliusova metoda zasniva se na reakciji koju je 1836. godine otkrio engleski kemičar James Marsh.²⁴ Određivanje arsena ovom metodom radilo se u aparaturi prikazanoj na slici 5. Uzorku arsena u Erlenmayerovoj tikvici dodaju se čisti elementarni cink u prahu i sumporna kiselina. Djelovanjem sumporne kiseline na elementarni cink razvija se vodik koji spojeve arsena u uzorku reducira do arsina. Oslobođeni arsin provodi se kroz cijev za sušenje s kalcijevim kloridom do cijevi u kojoj se zagrijava na $800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kako je plinoviti vodik nusprodukt, područje između cijevi koja se zagrijava i cijevi kojom prolazi struja vodika mora se hladiti da se vodik ne zapali (egzotermna reakcija). Stoga se na završetak cijevi stavi komadić pamuka natopljenog hladnom vodom. Zagrijavanjem dolazi do razgradnje hidrida arsena pa u unutrašnjosti cijevi, na hladnom staklu taloži sivi sloj metalnog arsena. Sivi,

metalni arsen stvara zrcalni nanos poznat kao „arsensko zrcalo“. Granica detekcije je ispod $0,1 \mu\text{g}$ arsena.²⁴



Slika 5. Aparatura za detekciju i određivanje arsena Marsh-Berzeliusovom metodom²⁴

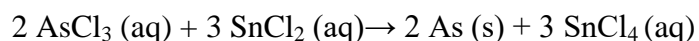
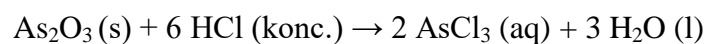
Gutzeitova metoda temelji se na redoks reakciji arsina i srebrovog nitrata pri čemu nastaje elementarno srebro.²⁴ Struja arsina razvija se kao u Marsh-Berzeliusovoj metodi. Reakcijom sumporne kiseline i elementarnog cinka razvija se vodik koji reducira spojeve arsena do arsina. Filter papir navlažen vodenom otopinom srebrovog nitrata dovede se u kontakt s razvijenim arsinom tako da se prinese otvoru tikvice iz koje izlazi plin. Žuta boja filter papira indicira prisutnost arsena u uzorku. Aparatura za određivanje prikazana je na slici 6. (ref. 24)



Slika 6. Aparatura za detekciju i određivanje arsena Gutzeitovom metodom²⁴

Bettendorfov test za arsen je karakterističan test kojim se As može dokazati i u prisutnosti antimona.²⁴

Test se temelji na redukciji arsenova(III) oksida u elementarni arsen pomoću kositrova(II) klorida, u otopini zakiseljenoj koncentriranom klorovodičnom kiselinom. Reakcija je na sobnoj temperaturi vrlo spora pa se zagrijava radi ubrzanja. U otopini kositrova(IV) klorida, elementarni arsen se izdvaja kao crni talog.²⁴



Arsen(III) u obliku arsenita može se odrediti titracijom s jodom (jodimetrijska titracija), a arsen(V) u obliku arsenata taloženjem sa srebrovim nitratom (Volhardtova taložna metoda). Obje metode koriste se za određivanje arsena samo u laboratorijima.¹⁸

2.3. Zaključak

U radu su opisane klasične i instrumentne metode određivanja arsena. Analize klasičnih kemičara Marsh-a, Berzelius-a i Gutzeit-a korištene su u forenzici za određivanje malih količina „kralja otrova“ u organima umrlih (granica detekcije 0,1 µg). Suvremenim instrumentnim metodama određuje se arsen u različitim uzorcima: vodi, hrani, kosi, noktima, krvi. ICP-MS je dobra metoda za određivanje ukupnog arsena s niskom granicom detekcije (0,1 µg L⁻¹). Vezanim sistemom HPLC-ICP-MS mogu se odvojiti i odrediti različiti spojevi arsena (granica detekcije između 0,14 i 0,33 µg L⁻¹). Spektrometrijska metoda s dietilditiokarbamatom (granica detekcije 40 µg L⁻¹) i ASV metoda (granica detekcije 0,15 µg L⁻¹) su relativno jeftine.

POPIS KRATICA:

MMA	Monomethyl arsenic acid
DMA	Dimethyl arsenic acid
ICP	Inductively coupled plasma
MS	Mass spectrometry
HPLC	High performance liquid chromatography
UV/VIS	Ultraviolet / visible
AES	Atomic emission spectroscopy
HG – AAS	Hydride generation – Atomic absorption spectroscopy
ASV	Anodic stripping voltammetry

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol84/mono84-6.pdf> (pristupljeno 30.08.2017.)
2. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija II. dio*, Školska knjiga, Zagreb, 1995, str. 789-794.
3. N. Raos, *Metali života – metali smrti*, Školska knjiga, Zagreb, 2008, str. 74-79.
4. https://www.google.hr/search?q=auripigment&rlz=1C2GTPM_enHR517HR519&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwjVnZuBhtfVAhVL1xQKHcrVC40QsAQIJw&biw=1600&bih=770#imgsrc=-8Z0HJQKH9cFBM (pristupljeno 14.08.2017.)
5. M. Habuda-Stanić, M. Kuleš, *Kem. ind.* **51** (2002) 337-342.
6. R. Vasiljević, *Hrvatske vode* **74** (2010) 297-304.
7. V. Oreščanin, *Hrvatske vode* **83** (2013) 7-16.
8. *Pravilnik o graničnim vrijednostima izloženosti opasnim tvarima pri radu i o biološkim graničnim vrijednostima* (2016), Narodne Novine
9. <http://www.mayomedicallaboratories.com/testcatalog/Clinical+and+Interpretive/8645> (pristupljeno 18.07.2017.)
10. http://www.isca.in/FORENSIC_SCI/Archive/v1/i4/1.ISCA-RJFS-2013-008.pdf (pristupljeno 19.07.2017.)
11. <http://www.annclinlabsci.org/content/25/3/264.full.pdf> (pristupljeno 19.07.2017.)
12. <https://www.nap.edu/read/6444/chapter/8#185> (pristupljeno 11.08.2017.)
13. P. Heitland, H. D. Koster, *Journal of Analytical Toxicology* **32** (2008) 308-310.
14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK230898/> (pristupljeno 03.08.2017.)
15. http://www.ispch.cl/actualidad/doc/pres_4.pdf (pristupljeno 29.08.2017.)
16. <http://www.banglajol.info/index.php/BJP/article/view/23644/16239> (pristupljeno 29.08.2017.)
17. https://www.google.hr/search?tbm=isch&q=Determination+of+arsenic+-+Silver+Diethyldithiocarbamate+Photometric+Method+Typical+apparatus&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwjf0oT5jv_VAhULtBQKHahQB4oQvwUIHygA&biw=1600&bih=770&dpr=1#imgsrc=7KeecdK9F2C2CM; (pristupljeno 14.08.2017.)
18. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 1, 189-191, 596, 835-841.

19. H. E. Taylor, *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, Academic Press, London, 2001, p. 15-17.
20. https://www.google.hr/search?q=inductively+coupled+plasma&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjT9u3-_dbVAhXB1xoKHZYCYvMQ_AUICigB&biw=1600&bih=721#imgsrc=moQDtY35lcCACM:
(pristupljeno 14.08.2017.)
21. M. Kopanica, L. Novotny, *Anal. Chim. Acta*, **368** (1998) 211-218.
22. G. N. Noskova, E. A. Zakharova, N. A. Kolpakova, A. S. Kabakaev, *J. Of Solid State Electrochem.* **16** (2012) 2459-2472.
23. I. Filipović, P. Sabioncello, *Laboratorijski priručnik, I. dio*, Tehnička knjiga, Zagreb, 1978, str. 260-261.
24. F. Bamford, *Poisons: Their isolation and identification*, Churchill, London, 1951, str. 74-84.